受託ラボプログラム（CLP）農薬の高速分析におけるカラム性能の直接比較

アプリケーション

環境

著者

Ken Lynam and John W. Henderson, Jr.
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

概要

受託ラボプログラム（CPL）農薬分析用のAgilent J&W高効率GCカラム（内径0.18 mm）の使用により、CPL農薬の一次分析と確認分析で優れた結果が得られました。本論文では、2種類の内径0.18 mmカラムについて、ピーク形状特性、ピーク分離、ベースラインの安定性を示すクロマトグラムを直接的に比較しています。水素キャリアガスとフロープログラミングを用いたこのプロトコルでは、20種類の農薬の一次分析および確認分析が6分未満で完了します。一次分析と確認分析で満足のいく結果が得られたのは、Agilent J&W高効率GCカラムのみでした。

はじめに

競争の激しい受託ラボ市場では、環境改善分野のサンプルに含まれる有機塩素系農薬（OCPs）の分析が、大きな割合を占める重要な分析となります。こうした分析には、標準的な受託ラボプログラム（CLP）農薬メソッドが用いられています。多くのケースでは、与えられたプロジェクトの作業期間中に多数のサンプルが分析され、ラボとクライアントの双方で分析コストがかさむことになります。内径0.18 mmのAgilent J&W高効率GCカラムを使用すれば、ラボの生産性を高めることができます[1-3]。

WoolとDecker [3]の論文では、米国環境保護局（テキサス州ヒューストン）ラボで得られた知見が報告され、CLP農薬分析における20 m×0.18 mmフォーマットのカラムの有用性が論じられています。この論文では、リテンションギャップを用いることで、分析カラムをマトリックスによる悪影響から保護し、内径の大きいカラムよりもサンプル容量が小さいというカラムの欠点を相殺できることが論じられています。本アプリケーションのカラム比較検討では、その主張を検証しました。使用した各カラムセットに関する一連の実験では、不活性化した5 m×内径0.25 mmのリテンションギャップを採用しました。

CPL農薬分析に使用できる内径0.18 mmのカラムは、複数の大手カラムベンダーが提供しています。アジレントは、内径0.18 mmのCLP農薬分析用カラムとして、一次分析用のDB-17msカラムと確認分析用のDB-XLBカラムの2つを推奨しています。ベンダーRは、CLP農薬の一次分析および確認分析用に、独自開発の固定相を備えた内径0.18 mmカラムを各種提供しています。

実験手法

分析には、2台の電子捕獲型検出器（μECD）と7683B オートサンプラを搭載したAgilent 6890N GCシステムを使用しました。Yスプリッタで2つの分析カラムに接続したリテンションギャップカラムの先端部に単一のスプリット／スプリットレス注入口によりサンプルを導入しました。初期クロマトグラフ条件の詳細については、表1に記載しています。

表1. 分析条件

GC：		Agilent 6890N
サンプラ：		Agilent 7683B、5 µLシリンジ（部品番号 5181-1273）、0.5 µL注入
キャリア：		水素（フロープログラミング、120°Cで69 cm/s、99 mL/min で増加させて4.4分で106 cm/s 、大型ユニバーサルトラップ（部品番号 RMSH-2）により精製）
注入口：		スプリット／スプリットレス；220°C、パルスドスプリットレス（0.5分で35 psi、1分でパージフロー40 mL/min、3分でガスセーバーフロー20 mL/min）
注入口ライナ：		不活性化シングルテーパーダイレクトコネクト（部品番号 1544-80730）
リテンションギャップ：		5 m×内径0.25 mm、不活性化（部品番号 160-2255-5）
Yスプリッタ：		不活性化石英（部品番号 5181-3398）
カラム：	1	20 m×0.18 mm×0.18µm、 DB-17ms（部品番号 121-4722）
	2	20 m×0.18 mm×0.18µm、 DB-XLB（部品番号 121-1222）
オーブン：		120°C（0.32分）；120°C/minから160°C；30°C/minから258°C（0.18分）；38.81°C/minから300°C（1.5分）
検出：		µECD 320°C；窒素メイクアップ；カラム+ メイクアップフロー（60 mL/min一定）

表2. フローパス部品

	説明	部品番号
バイアル：	アンバースクリューキャップ	5182-0716
バイアルキャップ：	青色スクリューキャップ	5282-0723
バイアルインサート：	100 µLガラス／ポリマーフィート	5181-1270
シリンジ：	5 µL	5181-1273
セプタム：	高性能グリーン	5183-4759
注入口ライナ：	不活性化シングルテーパーダイレクトコネクト	1544-80730
フェラル：	内径0.4 mmショート；85/15 Vespel/グラファイト	5181-3323
Yスプリッタ：	不活性化石英	5181-3398
シーリング樹脂：	ポリイミドシーリング樹脂	500-1200
20倍拡大鏡：	20倍拡大ルーペ	430-1020
チュービングカッター：	セラミックウエハーカラムカッター	5181-8836

この実験におけるフローパス部品には、表2記載のものを使用しました。本比較で用いたカラムは、いずれも同じ方法でGCに設置しました。

いずれのカラムについても、同一のリテンションギャップおよび注入口ライナを使用しました。表1および表2のクロマトグラフ条件（カラムを除く）を用いて、ベンダーRの推奨する独自カラムとアジレント製カラムを評価しました。この実験におけるフローパス部品には、表2に記載のものを使用しました。一次分析に用いたアジレント製カラムは、20 m×0.18 mm × 0.18 µmのDB-17msカラムです。ベンダーR製カラムは、独自の固定相の20 m × 0.18 mm×0.18 µmカラムを使用しました。確認分析に用いたアジレント製カラムは、20 m×0.18 mm×0.18 µmのDB-XLBカラムです。ベンダーR製カラムは、独自の固定相の20 m×0.18 mm × 0.14µmカラムを使用しました。

サンプルの調製

CLP農薬標準溶液は、AccuStandard（コネチカット州、米国）から購入しました。ULTRA RESI ANALYZEDグレードの2,2,4トリメチルペンタンは、J.T. Baker（ニュージャージー州、米国）から購入しました。

CLP-023R-160XおよびCLP-024R-160X濃縮物を、50-mLのメスフラスコに入れて2,2,4トリメチルペンタンで希釈し、その後、連続的に希釈しました。メスフラスコとピペットは、すべてクラスAのものを使用しました。本プロトコルにおける低濃度分析対象化合物の標準的な濃縮範囲は、3.2～80 ng/mLです。低濃度分析対象化合物のカラムへの注入量の範囲は、いずれのカラムについても、0.5-µL注入時に0.8～20 pgとなるようにしました。

Yスプリッタを用いたカラムの設置

Yスプリッタの設置にあたっては、チューブのカット前に、Yスプリッタに挿入するフューズドシリカチューブの外側をポリイミドシーリング樹脂の薄膜でコーティングしました。その後、コーティング部分でチューブをカットしました。カットした端を20倍の拡大ルーペで見て、切り口がなめらかかどうか、余分なシーリング剤がカラム内に入り込んでいないかどうかを確認しました。きちんとカットできていたら、外側にポリイミドシーリングを施したフューズドシリカを適切なYの枝部分に挿入し、45秒間そのまま固定して接着しました。接着部分にシーリング剤の薄いリングができていれば、正しく接着できています。このプロセスをまずは分析カラムで実施し、次にリテンションギャップを接続するYの幹部分で繰り返しました。この手法により、しっかりと確実に接続することができ、2か月以上にわたって温度プログラムサイクルを数百回繰り返しても、問題なく接続が維持されます。

メソッドトランスレーションソフトウェア／接続を成功させるために

この比較を開始するにあたり、内径0.18 mm のアジレント製DB-17msおよびDB-XLBカラム[4]におけるヘリウムキャリアガスを用いた分離条件を、水素キャリアガスを用いた条件セットに変換しました。ヘリウムキャリアガスでの分離におけるクロマトグラフィックなパラメータをAgilent GCメソッドトランスレーションソフトウェア[5–6]のトランスレーションテーブルに入力し、水素キャリアガスを用いたメソッドに変換しました。このソフトウェアの「Translate Only（トランスレーションのみ）」モードを用いて、11分のヘリウムキャリアメソッドを、同一カラムを用いた7.3分の水素キャリアメソッドに変換しました。

分析の目的がフロープログラミングを用いた分析スピードの向上に移ったときにのみ、ヘリウムから水素への変換以外のメソッド開発が必要となりました。フロープログラミングそのものは、メソッドトランスレーションソフトウェアの対象外です。本実験では、フロープログラミングを用いて保持力の高いピークの溶出を高速化させました。また、温度プログラムにさらなる修正を施すことで、使用するアジレントカラムでの分離能をできる限り保ったまま、分析スピードを向上させました。

結果と考察

表1に示した条件を適用した内径0.18 mm のアジレント製DB-17msおよびDB-XLBカラムでは、水素キャリアによりCLP農薬を良好に分離できました。ベンダーR製の内径0.18 mmカラムは、以下の条件を用いて評価しました：表1に記載の条件、ベンダーRのウェブサイトに記載の条件、本分析でベンダーR製カラムを使用するために最適化した条件。本実験の目的は、できる限り公平かつ客観的に比較をおこなうことです。

クロマトグラムを比較する際には、注入濃度として、CLPプロコトルの低濃度分析対象化合物に標準的に用いられる濃度（3.2 ng/mL）を選択しました。この濃度を一貫して用いることで、一定の参照ポイントが得られます。また、クロマトグラフィックな悪影響が隠されてしまうという、高濃度でしばしば見られる現象も防ぐことができます。また、各クロマトグラムにYスケールを含めることで、各グラフ内にもう1つの参照ポイントを設け、比較を容易にすることができます。この例のクロマトグラムで注目すべき主な点は、ピーク分離、ピークテーリングの有無、μECDの温度依存性ドリフトです。

この実験では、アジレントのDB-17msカラムを一次分析カラムとして使用しました。名目上3.2 ng/mLの低濃度の対象農薬を注入して得られたクロマトグラムを、図1の上半分に示しました。このカラムでは、目的となるピークのすべてが6分未満で分離され、左右対称のピークが得られました。また、μECDのバックグラウンドドリフトも最小限に抑えられています。クロマトグラムの各ピークの数字に対応する化合物を図3に示しました。

この実験では、アジレントのDB-XLB（20 m × 0.18 mm × 0.18 μm）カラムを確認分析に使用しました。名目上3.2 ng/mLの低濃度の対象農薬を注入して得られたクロマトグラムを、図1の下半分に示しました。このカラムでは、目的となるピークのうち20ピークが分離され、ピーク10と11についてもほぼベースラインレベルまで分離しました。ここでも、シャープな左右対称のピークが得られ、μECDの温度依存性ベースラインドリフトも最小限に抑えられています。確認カラムで完全に分離できたのは、目的となる22ピークのうち20ピークだけで、これは理想的とはいえませんが、ピーク確認には十分な分離能が観察されました。

図1に適用されるピーク同定テーブルには、アジレント製カラムで分離されるCPL農薬のみを記載しています。独自の選択性を持つこれらのカラムの溶出順序については、実験に先立って確認しました。選択性の異なるベンダーR製カラムの溶出順序を確認するためには、各標準物質の注入や質量スペクトルでの確認が必要となります。

表3. CLP標準化合物リスト

1. テトラクロロ-*m*-キシレン	12. 4,4'- DDE
2. α-BHC	13. ディルドリン
3. γ-BHC	14. エンドリン
4. β-BHC	15. 4,4'- DDD
5. δ-BHC	16. エンドスルファンII
6. ヘプタクロル	17. 4,4'- DDT
7. アルドリン	18. エンドリンアルデヒド
8. ヘプタクロルエポキシド	19. エンドスルファンサルフェート
9. γ-クロルデン	20. メトキシクロル
10. α-クロルデン	21. エンドリンケトン
11. エンドスルファンI	22. デカクロロビフェニル

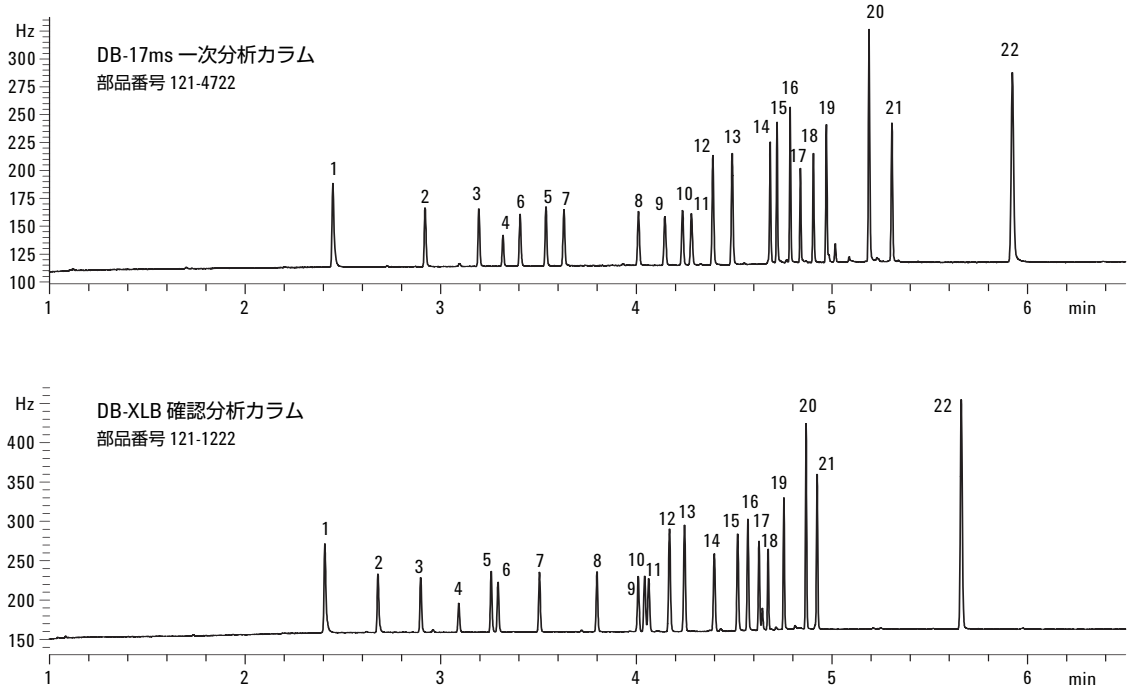

図1. 表1の条件を用いて、YスプリッタによりDB-17ms（部品番号 121-4722）一次分析カラムおよびDB-XLB（部品番号 121-1222）確認分析カラムに濃度3.2 ng/mLの低濃度分析用農薬標準溶液を0.5 µL注入して得られたクロマトグラム

ベンダーR製の一次分析カラムには、独自の固定相を備えた20 m×0.18 mm×0.18 µmカラムを使用しました。名目上3.2 ng/mLの低濃度の対象農薬を注入して得られたクロマトグラムを、図2の上半分に示しました。このカラムでは、目的となる22ピークのうち20ピークが分離されましたが、一部の化合物ではピークのテーリングが見られました。µECDの温度依存性ベースラインドリフトは最小限に抑えられています。図中の矢印は、共溶出とピークのテーリングを示しています。

ベンダーR製の確認分析カラムには、独自の固定相の20 m×0.18 mm×0.14 µmカラムを使用しました。名目上3.2 ng/mLの低濃度の対象農薬を注入して得られたクロマトグラムを、図2の下半分に示しました。このカラムでは、目的となる22ピークすべてが分離されていますが、一部の化合物種ではピークテーリングが見られました。また、大幅なµECDの温度依存性ベースラインドリフトも確認されました。図中の矢印はピークのテーリングとベースラインドリフトを示しています。ベースラインドリフトは、この例では100 Hz でした。

ベンダーRが推奨する自社カラム用の分離条件では、同社のサイトで示されているものと同様の結果は得られませんでした。この原因は、ベンダーR側のミスと思われます。ウェブサイトの図中キャプションに記載の推奨条件では、2分間にわたって最高推奨温度よりも10℃高い温度を維持することが求められています。ここで求められている温度は330℃ですが、カラムの箱に記載されている確認分析カラム用の温度プログラム上限は320℃です。ベンダーR製確認分析カラムでは、上限より20℃も低い300℃にしか達しない温度プログラムでも、大幅なブリードが確認されました。

ベンダーRの一次分析カラムで共溶出したピークを分離するために、いくつかの試みを実施したところ、結果は改善されましたが、依然として分離能は不完全なままでした。図3に示しているような結果を得るためには、流速を大幅に低くして、温度とフロープログラミングパラメータの両方を修正する必要がありました。この注入に用いたクロマトグラフ条件を表4に示しました。フローパス部品は、表2に記載しているのと同じものを使用しました。

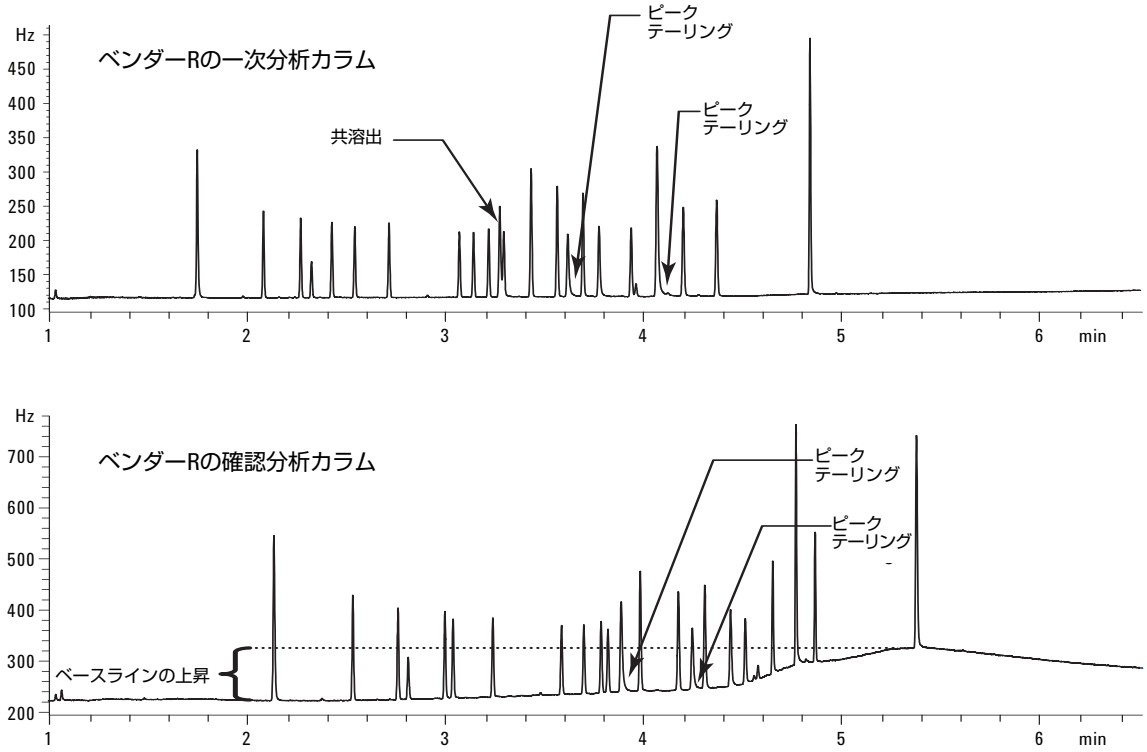

図2. 表1の条件を用いて、Yスプリッタによりベンダー Rの一次分析カラムおよび確認分析カラムに濃度3.2 ng/mLの低濃度分析用農薬標準溶液を0.5 µL注入して得られたクロマトグラム

ベンダーR製の一次分析カラムには、独自の固定相の20 m×0.18 mm×0.18 µmカラムを使用しました。名目上3.2 ng/mLの低濃度の対象農薬を注入して得られたクロマトグラムを、図3の上半分に示しました。このカラムでも、目的となる22ピークのうち20ピークが分離されましたが、依然として一部の化合物種ではピークテーリングが見られました。µECDの温度依存性ベースラインドリフトは最小限に抑えられています。図中の矢印は、分離していないピークとピークテーリングを示しています。

ベンダーR製の確認分析カラムには、独自の固定相の20 m×0.18 mm×0.14 µmカラムを使用しました。名目上3.2 ng/mLの低濃度の対象農薬を注入して得られたクロマトグラムを、図3の下半分に示しました。このカラムでは、目的となる22ピークすべてが分離されていますが、一部の化合物種ではピークテーリングが見られました。また、大幅なµECDの温度依存性ベースラインドリフトも確認されました。図中の矢印はピークのテーリングとベースラインドリフトを示しています。

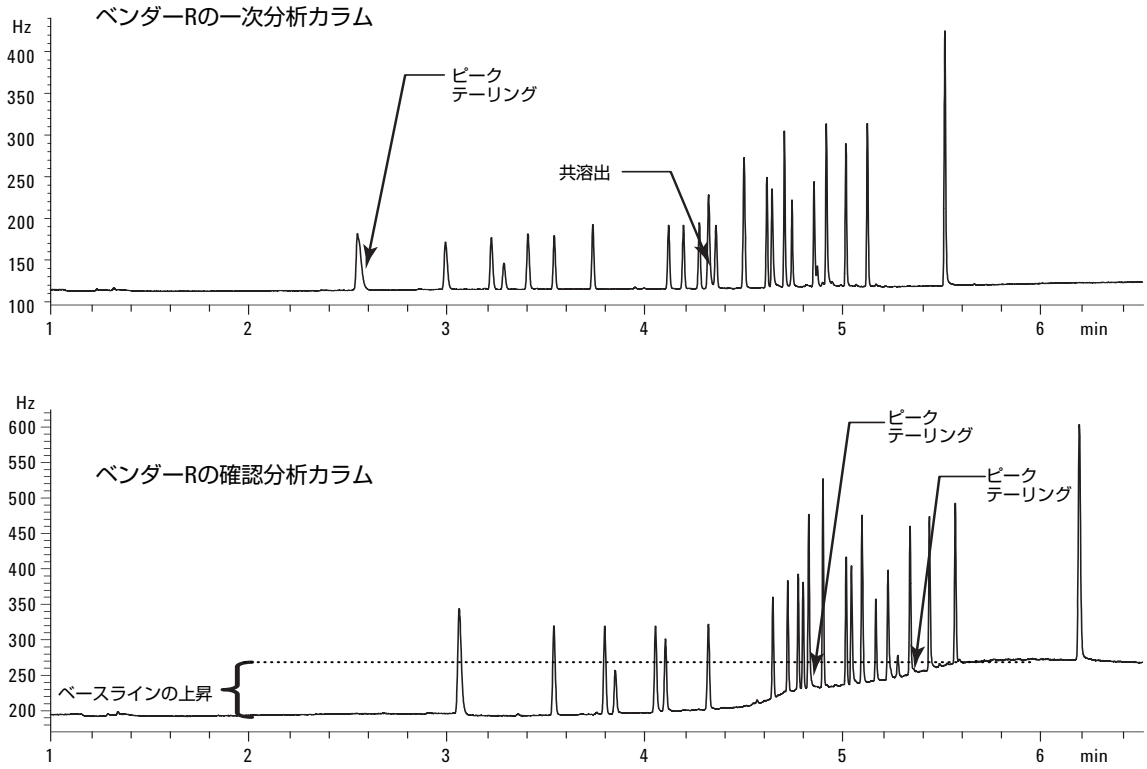

図3. 表4の条件を用いて、Yスプリッタによりベンダーの一次分析カラムおよび確認分析カラムに濃度3.2 ng/mLの低濃度分析用農薬標準溶液を0.5 µL注入して得られたクロマトグラム

表4. クロマトグラフ条件

GC：		Agilent 6890N
サンプラ：		Agilent 7683B、5 µLシリンジ (部品番号 5181-1273)、0.5 µL注入
キャリア：		水素(フロープログラミング、 120°Cで45 cm/s、99 mL/min で増加させて 4.4分で72 cm/s 、大型ユニバーサルトラップ (部品番号 RMSH-2) により精製)
注入口：		スプリット／スプリットレス； 220°Cパルスドスプリットレス (0.5分で35 psi、1分でパージフロー40 mL/min、 3分でガスセーバーフロー20 mL/min)
注入口ライナ：		不活性化シングルテーパーダイレクトコネクト (部品番号 1544-80730)
リテンションギャップ：		5 m×内径0.25 mm、不活性化 (部品番号 160-2255-5)
Yスプリッタ：		不活性化石英 (部品番号 5181-3398)
カラム：	1	20 m×0.18 mm×0.18 µm 一次分析用カラム
	2	20 m×0.18 mm×0.14 µm 確認分析用カラム
オーブン：		120°C (0.50分)；60°C/minから160°C； 30°C/minから260°C；40°C/minから300°C (2.0分)
検出：		µECD 320°C；窒素メイクアップ； カラム+ メイクアップフロー (60 mL/min一定)

まとめ

アジレントの内径0.18 mmの一次分析カラムは、ベンダーRの製品よりも優れています。DB-17ms一次分析カラムでは、目的となる22ピークすべてが6分未満で分離され、左右対称のシャープなピーク形状が得られました。ベースラインドリフトも最小限に抑えられています。ベンダーR製の一次分析カラムでは、目的となる22ピークのうち20ピークしか分離できず、一部のピークでは明らかなピークテーリングが見られました。

アジレントの内径0.18 mmの確認分析カラムも、ベンダーRの製品よりも優れています。DB-XLBカラムでは、目的となる22ピークのうち20ピークが6分未満で分離され、残りの2ピークもほぼベースラインまで分離されました。左右対称のシャープなピーク形状が得られ、温度依存性ベースラインドリフトも最小限に抑えられました。22ピーク中20ピークの分離は、完全に理想的とはいえませんが、ピーク確認の分離能としては十分なものです。ベンダーR製の確認分析カラムでは、目的となる22ピークすべてが分離されましたが、明らかなピークテーリングが見られたうえ、温度依存性のベースラインドリフトも許容範囲を超えるレベルでした。

本実験で使用したDB-17msおよびDB-XLBカラムでは、µECDで検出されるブリードレベルがきわめて低いことが示されています。これらのカラムにより実現するベースラインの安定性は、検出限界の向上や統合の容易化、そして長期的な

結果の信頼性向上につながります。これらのカラムは、CLP農薬以外の分析にも使用できる汎用性も備えています。

Agilent J&W高効率GCカラムを使えば、信頼性の高いCLP農薬の一次分析および確認分析を、標準的なガスクロマトグラフを用いて6分未満で実施することができます。

参考文献

1. I. L. Chang, M. S. Klee, and J. Murphy, “Validation Analysis of EPA CLP Target Organochlorine Pesticides with the Agilent 6890 Series GC and Micro-ECD,” Agilent publication 5966-3742E, February 1998
2. C. George, “Rapid Analysis of CLP Pesticides Using High-Temperature DB-35ms and DB-XLB Columns,” Agilent publication 5988-4973EN, December 18, 2001
3. L. Wool and D. Decker, “Practical Fast Gas Chromatography for Contract Laboratory Program Pesticide Analysis,” Journal of Chromatographic Science, Vol. 40, September 2002
4. K. Lynam、W. Long、「ヘリウムキャリアガスを用いた内径0.18 mmの高効率GCカラムによる受託ラボプログラム（CLP）農薬分析」資料番号5989-7818JAJP、2008年1月7日
5. Agilentメソッドトランスレーションソフトウェアをダウンロードするには、以下のリンク先を参照してください：http://www.chem.agilent.com/cag/servsup/usersoft/files/GCTS.htm
6. K. Lynam, “Agilent J&W High-Efficiency Capillary Columns: Productivity-Enhancing Tools for Fast GC Applications,” Agilent publication 5989-7499-EN, November 7, 2007

詳細情報

アジレントの製品とサービスの詳細については、
ウェブサイト（www.agilent.com/chem/jp）をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により
付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、仕様等は、予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
February 26, 2008
5989-8031JAJP

Agilent Technologies